

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): ENDO, Keiji et al

Application No.:

Group:

Filed: June 9, 2000

Examiner:

For: MUTANT ALPHA-AMYLASES

TECH CENTER 1600
09/590375
06/09/00
Barcode

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, D.C. 20231

June 9, 2000
2173-0120P

Sir:

#5
10/29/00

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the applicant hereby claims the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	11-163569	06/10/99

A certified copy of the above-noted application(s) is (are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By:

JOHN W. BAILEY
Reg. No. 32,881
P. O. Box 747
Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment
(703) 205-8000
/dpt

ENDO, Keiji et al
June 9, 2000
Birech, Stewart, Kolasch & Birech
703-205-8000
2173-0120P 102/1
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

FP-KS-0555
US

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月10日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第163569号

出願人
Applicant(s):

花王株式会社

00/60/90
563035/60
JC829
Barcode

RECEIVED

FEB - 5 2001

TC 172-2000M

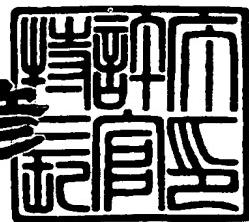
RECEIVED
FEB 07 2001

TECH CENTER (NEWARK)

2000年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3023988

【書類名】 特許願
【整理番号】 P02341106
【提出日】 平成11年 6月10日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 9/28
C12N 15/09
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 遠藤 圭二
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 五十嵐 一暁
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 林 康弘
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 萩原 浩
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 尾崎 克也
【特許出願人】
【識別番号】 000000918
【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異 α -アミラーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する α -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の1番目のTyr、16番目のGlu、49番目のAsn、84番目のGlu、144番目のSer、167番目のGln、169番目のTyr、178番目のAla、188番目のGlu、190番目のAsn、205番目のHis及び209番目のGlnのうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の1残基以上を置換又は欠失させてなる変異 α -アミラーゼ。

【請求項2】 配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する α -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列のアミノ末端から11~100アミノ酸残基に相当する配列を他の液化型 α -アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換させてなる変異 α -アミラーゼ。

【請求項3】 配列番号1のアミノ酸配列の1番目のAspから19番目のGlyまでに相当する配列を他の液化型 α -アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換させたものである請求項2記載の変異 α -アミラーゼ。

【請求項4】 他の液化型 α -アミラーゼが配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するものである請求項2又は3記載の変異 α -アミラーゼ。

【請求項5】 配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する α -アミラーゼに対して、請求項1記載のアミノ酸残基の置換又は欠失及び請求項2~4のいずれかに記載のアミノ酸配列の置換から選ばれる2種以上の置換又は欠失を組み合わせて変異させた変異 α -アミラーゼ。

【請求項6】 アミノ酸残基の置換が配列番号1のアミノ酸配列の49番目のAsnに相当するアミノ酸残基をSer、167番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、169番目のTyrに相当するアミノ酸残基をLys、190番目のAsnに相当するアミノ酸残基をPhe、205番目のHisに相当す

るアミノ酸残基をA r g 又は2 0 9 番目のG l n に相当するアミノ酸残基をV a l に置換させてなるものであり、アミノ酸配列の置換が配列番号1の1番目のA s p から1 9 番目のG l y までのアミノ酸配列を配列番号2の1番目のH i s から2 1 番目のG l y までのアミノ酸配列に置換させてなるものである請求項5記載の変異 α -アミラーゼ。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか1項記載の変異 α -アミラーゼをコードする遺伝子又は当該遺伝子を含有するベクター。

【請求項8】 請求項7に記載のベクターで形質転換された細胞。

【請求項9】 請求項8に記載の形質転換細胞を培養することを特徴とする変異 α -アミラーゼの製造方法。

【請求項10】 請求項1～6のいずれか1項記載の変異 α -アミラーゼを含有する洗浄剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、優れた耐熱性を有し、特に洗剤用酵素として有用な変異液化型アルカリ α -アミラーゼ及びその遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

従来、 α -アミラーゼ [EC.3.2.1.1] を洗剤用として利用する場合には、澱粉を高ランダムに分解でき、アルカリ性で安定で且つキレート成分、酸化漂白成分に対しても安定である液化型アルカリ α -アミラーゼが好ましいとされている。しかしながら、液化型アミラーゼは一般に、酵素の構造維持にカルシウムイオンが重要であり、キレート剤の存在下ではその安定性が低下し、また作用至適pHに關しても中性ないし弱酸性領域であるものが殆どであった。

斯かる状況の下、本発明者らは、土壤中から分離した好アルカリ性Bacillus s p KSM-K38 (FERM P-16817) 株及び同KSM-K36 (FERM P-16816) 株の生産する酵素が、従来の液化型 α -アミラーゼでは失活が認められる高い濃度のキレート剤によって全く活性の低下を示さず、更に界面活性剤や酸化剤に対する耐性を有し

ていること、また、従来の液化型 α -アミラーゼに比べて、アルカリ側で高い活性を有し洗剤用として有用であることを見出している(特願平10-362487号)。

【0003】

しかし、当該酵素は50℃以上の温度では失活を示すことから、衣料や食器の洗浄が10~60℃付近で行うのが一般的あることを考えるとその耐熱性がやや不十分であった。

本発明は、アルカリ側で高い活性を有し、キレート成分、酸化漂白成分に対しても安定である液化型アルカリ α -アミラーゼであって、且つ優れた耐熱性を有する α -アミラーゼを提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、液化型アルカリ α -アミラーゼについて種々の変異酵素を取得、検討した結果、KSM-K38由来アミラーゼのアミノ酸配列(配列番号1)の特定のアミノ酸残基に変異を与えることにより、キレート剤耐性や酸化剤耐性の特性及びアルカリ領域に於ける高い比活性を失うことなく耐熱性が向上すること、またこれらの変異を組み合わせることによって更なる耐熱化が可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0005】

即ち、本発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する α -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の11番目のTyr、16番目のGlu、49番目のAsn、84番目のGlu、144番目のSer、167番目のGln、169番目のTyr、178番目のAla、188番目のGlu、190番目のAsn、205番目のHis及び209番目のGlnのうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の1残基以上を置換又は欠失させてなる変異 α -アミラーゼを提供するものである。

【0006】

また本発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する α -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列のアミ

ノ末端から11～100アミノ酸残基に相当する配列を他の液化型 α -アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換させてなる変異 α -アミラーゼを提供するものである。

【0007】

また本発明は、この変異 α -アミラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を有するベクター、該ベクターで形質転換された細胞、該形質転換細胞を培養することを特徴とする変異 α -アミラーゼの製造方法を提供するものである。

【0008】

更に本発明は、この変異 α -アミラーゼを含有する洗浄剤組成物を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の変異 α -アミラーゼは、配列番号1に示したアミノ酸配列又は該配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する液化型アルカリ α -アミラーゼをコードする遺伝子を変異させて得られるものであるが、アミノ酸の欠失・置換により耐熱性を向上させた例は従来の液化型 α -アミラーゼについても行われていた。例えば、B. amyloliquefaciens由來の酵素において177番目のArgから188番目のGly残基を欠失させたもの(J. Biol. Chem., 264, 18933, 1989)、B. licheniformisの酵素において、133番目のHisをTyrに置換したもの(J. Biol. Chem., 265, 15481, 1990)が報告されている。しかし、本発明で用いられる液化型アルカリ α -アミラーゼは、従来の液化型 α -アミラーゼとのアミノ酸相同性は低く、また上記の177番目のArgから188番目のGly残基に相当する部位は既に欠失しており、また、133番目のHis相当のアミノ酸は既にTyrであり、従来酵素の例が必ずしも適用できるものではない。即ち、本発明における耐熱性を向上させるためのアミノ酸配列の変異はこれまでの例とは全く異なるものである。

【0010】

当該液化型アルカリ α -アミラーゼの例としては、本発明者らが土壤中から分離したBacillus sp. KSM-K38 (FERM P-16817) 株由来であり、配列番号1のアミ

ノ酸配列を有する酵素（特願平10-362487号）、或いは同KSM-K36(FERM P-16816) 株由来であって配列番号1のアミノ酸配列と約95%の相同性を有する酵素（配列番号4）（特願平10-362487号）等が挙げられる。尚、アミノ酸配列の相同性はLipman-Pearson法（Science, 227, 1435, 1985）によって計算される。

【0011】

本発明の変異 α -アミラーゼの取得は、先ず液化型 α -アミラーゼを生産する微生物より、当該液化型 α -アミラーゼをコードする遺伝子をクローニングするが、その方法は、一般的な遺伝子組換え技術を用いれば良く、例えば、特開平8-336392号記載の方法を用いることができる。遺伝子の例としては、配列番号3及び配列番号5に示されるものが挙げられる。

【0012】

次に得られた遺伝子に対して変異を与えるが、その方法としても一般的に行われている部位特異的変異の方法であればいずれも採用でき、例えば宝酒造社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット等を用いて行うことができる。また、リコンビナントPCR（polymerase chain reaction）法（PCR protocols, Academic press, New York, 1990）を用いることによって、遺伝子の任意の配列を他の遺伝子の該任意の配列に相当する配列と置換することが可能である。

【0013】

本発明における耐熱化変異は、配列番号1に示されるアミノ酸配列の11番目のTyrに相当するアミノ酸残基をPhe、16番目のGluに相当するアミノ酸残基をPro、49番目のAsnに相当するアミノ酸残基をSer、84番目のGluに相当するアミノ酸残基をGln、144番目のSerに相当するアミノ酸残基をPro、167番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、169番目のTyrに相当するアミノ酸残基をLys、178番目のAlaに相当するアミノ酸残基をGln、188番目のGluに相当するアミノ酸残基をAsp、190番目のAsnに相当するアミノ酸残基をPhe、205番目のHisに相当するアミノ酸残基をArg又は209番目のGlnに相当するアミノ酸残基

をV_a1に置換する変異が望ましい。

【0014】

また、本発明の配列番号1のアミノ酸配列のアミノ末端(A_sp)から11～100アミノ酸残基に相当するアミノ酸配列、好ましくは、1番目のA_spから19番目のG₁yに相当する配列を、他の液化型α-アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換することによっても耐熱化を達成することができる。

【0015】

置き換える他の液化型α-アミラーゼの例としては、例えば配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する酵素が挙げられ、その配列の前記1番目のA_spから19番目のG₁yに相当する部位は1番目のH_isから21番目のG₁yである。当該酵素は、Bacillus sp. KSM-AP1378 (FERM BP-3048)株由来の液化型α-アミラーゼであり、その遺伝子配列は特開平8-336392号において開示されている。

【0016】

本発明の変異α-アミラーゼにおいては、更に上記の各種アミノ酸残基の置換又は欠失及びアミノ酸配列の置換から選ばれる2種以上の置換又は欠失を組み合わせた変位も有効であり、組み合わせることにより、より耐熱性が向上した変異酵素を得ることができる。即ち、変異の組み合わせ方は、各種アミノ酸残基の置換又は欠失の2種以上を組み合わせたもの、アミノ酸配列の置換を2種以上組み合わせたもの及びアミノ酸残基の置換又は欠失とアミノ酸配列の置換を2種以上組み合わせたものが挙げられるが、好ましくは49番目のA_snに相当するアミノ酸残基をS_er、167番目のG₁nに相当するアミノ酸残基をG₁u、169番目のT_yrに相当するアミノ酸残基をL_ys、190番目のA_snに相当するアミノ酸残基をP_he、205番目のH_isに相当するアミノ酸残基をA_rg若しくは209番目のG₁nに相当するアミノ酸残基をV_a1に置換する変異、又は1番目のA_spから19番目のG₁yまでに相当する配列を配列番号2に示されるアミノ酸配列の1番目のH_isから21番目のG₁yまでのアミノ酸配列に置換する変異のうちいずれか2種以上の変異を適宜組み合わせるとよい。

更に、最適な組み合わせの例としては、49番目のAsnに相当するアミノ酸残基をSer、167番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、169番目のTyrに相当するアミノ酸残基をLys、190番目のAsnに相当するアミノ酸残基をPhe、205番目のHisに相当するアミノ酸残基をArg及び209番目のGlnに相当するアミノ酸残基をValに置換する変異の組み合わせ、或いは1番目のAspから19番目のGlyまでに相当する配列を配列番号2に示されるアミノ酸配列の1番目のHisから21番目のGlyまでのアミノ酸配列に置換する変異と、167番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、169番目のTyrに相当するアミノ酸残基をLys、190番目のAsnに相当するアミノ酸残基をPhe、209番目のGlnに相当するアミノ酸残基をValに置換する変異の組み合わせ等が挙げられる。

【0017】

また、上記の変異に、耐熱性以外の特性を改良する変異、例えば、組換え枯草菌による酵素生産性を向上させる128番目のAspに相当するアミノ酸残基をValに置換する変異や酸化剤耐性をより強化する107番目のMetに相当するアミノ酸残基をLeuに置換する変異、更に衣料用洗剤における洗浄力を増強させる188番目のGluに相当するアミノ酸残基をIleに置換する変異等を組み合わせることも可能である。

【0018】

かくして得られる本発明変異 α -アミラーゼは、高いキレート剤耐性の優れた特性及びアルカリ領域に於ける高い比活性を失うことなく、熱に対する安定性が向上することから、自動食器洗浄機用洗浄剤、衣料用洗浄剤、纖維糊抜き剤として有用である。

【0019】

当該洗浄剤には、上記変異 α -アミラーゼ以外に、更に枝切り酵素（例えばプロラナーゼ、イソアミラーゼ、ネオプロラナーゼなど）、 α -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、リバーゼ、ペクチナーゼ、プロトペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、パーオキシダーゼ、ラッカーゼ及びカタラーゼから選ばれる1種または2種以上の酵素を配合することができる。

【0020】

また、洗浄剤に通常配合されるアニオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオニン界面活性剤、カチオン界面活性剤等の界面活性剤、キレート剤、アルカリ剤、無機塩、再汚染防止剤、塩素捕捉剤、還元剤、漂白剤、蛍光染料可溶化剤、香料、ケーキング防止剤、酵素の活性化剤、酸化防止剤、防腐剤、色素、青味付け剤、漂白活性化剤、酵素安定化剤、調節剤等を配合することができる。

【0021】

本発明の洗浄剤組成物は、上記変異 α -アミラーゼ及び上記公知の洗浄成分を組み合わせて常法に従い、製造することができる。洗浄剤の形態は、用途に応じて選択することができ、例えば、液体、粉末、顆粒等にすることができる。また、本発明洗浄剤組成物は、衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤、配水管洗浄剤、義歯洗浄剤等として使用できるが、特に衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤として好適に使用することができる。

【0022】

また、本発明の変異 α -アミラーゼは、澱粉液化・糖化用組成物として用いることができ、更にグルコアミラーゼ、マルターゼ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ、ネオプルラナーゼ、などから選ばれる1種または2種以上の酵素を配合し、変異 α -アミラーゼとともに澱粉に作用させることもできる。

【0023】

更に、本発明の変異 α -アミラーゼは、纖維の糊抜き剤組成物として用いることができ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ或いはネオプルラナーゼ等の酵素と共に配合することもできる。

【0024】

【実施例】

アミラーゼ活性及びタンパク質量の測定

各酵素のアミラーゼ活性及びタンパク質量は以下に示す方法で行った。

アミラーゼ活性測定は、3, 5-ジニトロサリチル酸法(DNS法)で測定した。50 mMグリシン緩衝液(pH10)中に可溶性澱粉を含む反応液中、50℃で15分間の反応を行った後、生成した還元糖をDNS法で定量することによ

って測定した。酵素の力価は1分間に $1 \mu\text{mol}$ のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を1単位とした。

蛋白量の測定は、牛血清アルブミンを標準として、Bio-Rad社のProtein Assay Kitを用いて定量した。

【0025】

参考例1 アルカリ液化型アミラーゼのスクリーニング

土壤約0.5gを滅菌水に懸濁し、80℃で15分間加熱処理した。この熱処理液の上清を適当に滅菌水で希釈して、分離用寒天培地（培地A）に塗布した。次いで、これを30℃で2日間培養し、集落を形成させた。集落の周に澱粉溶解に基づく透明帯を形成するものを選出し、これをアミラーゼ生産菌として分離した。更に、分離菌を培地Bに接種し、30℃で2日間好気的に振盪培養した。培養後、遠心分離した上清液について、キレート剤（EDTA）耐性能を測定し、更に最適作用pHを測定して、本発明のアルカリ液化型アミラーゼ生産菌をスクリーニングした。

【0026】

上述の方法により、Bacillus sp. KSM-K38 (FERM P-16817) 株及びBacillus sp. KSM-K36 (FERM P-16816) 株を取得することができた。

【0027】

培地A	トリプトン	1. 5 %
	ソイトン	0. 5 %
	塩化ナトリウム	0. 5 %
	着色澱粉	0. 5 %
	寒天	1. 5 %
	Na ₂ CO ₃	0. 5 %
	(pH 10)	

【0028】

培地B	トリプトン	1. 5 %
	ソイトン	0. 5 %
	塩化ナトリウム	0. 5 %

可溶性澱粉 1.0 %
Na₂CO₃ 0.5 %
(pH 1.0)

【0029】

KSM-K38株及びKSM-K36株の菌学的性質を表1に示す。

【0030】

【表1】

	KSM-K36株	KSM-K38株
(a)顕微鏡的観察結果	菌体の大きさは、K36株が $1.0\sim1.2\mu m\times2.4\sim5.4\mu m$ 、K38株が $1.0\sim1.2\mu m\times1.8\sim3.8\mu m$ の桿菌であり、菌体の準備或いは中央に楕円形の内生胞子($1.0\sim1.2\mu m\times1.2\sim1.4\mu m$)を作る。周鞭毛を有し運動性がある。グラム染色は陽性。抗酸性はない。	
(b)各種培地に於ける生育状態 尚、本菌株は好アルカリ性のため以下の試験では、用いた培地に0.5%炭酸ナトリウムを添加した。		
・肉汁寒天平板培養	生育状態は良い。集落の形状は円形である。表面は平滑、周縁は粗である。又、集落の色調は淡黄土色である。 生育する。 生育する。 生育状態は良い。ゼラチンの液化は認められない。 変化しない。	生育状態は良い。集落の形状は円形である。表面は平滑、周縁はスムーズである。又、集落の色調は黄褐色である。 生育する。 生育する。 生育状態は良い。ゼラチンの液化は認められない。 変化しない。
・肉汁寒天斜面培養		
・肉汁液体培養		
・肉汁ゼラチン穿刺培養		
・リトマスマルク培地		
(c)生理学的性質		
・硝酸塩の還元及び脱窒反応	硝酸塩の還元は陽性。 脱窒反応は陰性。	硝酸塩の還元は陽性。 脱窒反応は陰性。
・MRテスト	培地がアルカリ性の為、判定できます。	培地がアルカリ性の為、判定できます。
・V-Pテスト	陰性。	陰性。
・インドールの生成	陰性。	陰性。
・硫化水素の生成	陰性。	陰性。
・澱粉の加水分解	陽性。	陽性。
・クエン酸の利用	クリステンセン培地で生育し、コーナー培地及びシモンズ培地では生育しない。	クリステンセン培地で生育し、コーナー培地及びシモンズ培地では生育しない。
・無機窒素源の利用	硝酸塩は利用するが、アンモニウム塩は利用しない。	硝酸塩は利用するが、アンモニウム塩は利用しない。
・色素の生成	キングB培地で淡黄色の色素を生成。	陰性。
・ウレアーゼ	陰性。	陰性。
・オキシダーゼ	陰性。	陰性。
・カタラーゼ	陽性。	陽性。
・生育の範囲	生育の温度範囲は、15~40°C、生育最適温度範囲は30~37°Cである。 生育のpH範囲は、pH8.0~11.0、生育最適pHはpH10.0~11.0である。	生育の温度範囲は、15~40°C、生育最適温度は30°Cである。 生育のpH範囲は、pH9.0~11.0、生育最適pHは同様である。
・酸素に対する態度	好気的。	好気的。
・O-Fテスト	生育せず。	生育せず。
・糖の利用性	D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、ラクトース、グリセリン、メリピオース、リボース、D-グルコース、D-マンノース、マルトース、シュークロース、トレハロース、D-マンニット、澱粉、ラフィノース及びD-フラクトースを利用する。	D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、ラクトース、グリセリン、メリピオース、リボース、D-グルコース、D-マンノース、マルトース、シュークロース、トレハロース、D-マンニット、澱粉、ラフィノース及びD-フラクトースを利用する。
・食塩含有培地に於ける生育	食塩濃度が12%では生育するが、15%では生育できない。	食塩濃度が12%では生育するが、15%では生育できない。

【0031】

参考例2 KSM-K38株及びKSM-K36株の培養

参考例1の液体培地Bに、KSM-K38株あるいはKSM-K36株を接種し、30℃で2日間好気的に振盪培養した。遠心分離上清についてアミラーゼ活性(pH8.5)を測定した結果、培養液1L当たり、それぞれ557U及び1177Uの活性を有していた。

【0032】

参考例3 アルカリ液化型アミラーゼの精製

参考例2で得られたKSM-K38株の培養上清液に80%飽和濃度になるよう硫酸アンモニウムを加えて攪拌後、生成した沈殿を回収し、2mM CaCl₂を含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、同緩衝液に対して一晩透析した。得られた透析内液を同緩衝液で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラムに添着し、同緩衝液を用いて0-1Mの食塩の濃度勾配によりタンパクを溶出した。活性画分を同緩衝液にて透析後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより得た活性画分を上記緩衝液にて透析することによってポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度10%)及びソディウムドデシル硫酸(SDS)電気泳動で单一のバンドを与える精製酵素を得ることができた。尚、KSM-K36株の培養上清液からも同様の方法で精製酵素を得ることができた。

【0033】

参考例4 酵素特性

両精製酵素の特性は以下の通りである。

(1) 作用

いずれも、澱粉、アミロース、アミロペクチン及びそれらの部分分解物のα-1,4グルコシド結合を分解し、アミロースからはグルコース(G1)、マルトース(G2)、マルトトリオース(G3)、マルトテトラオース(G4)、マルトペンタオース(G5)、マルトヘキサオース(G6)及びマルトヘプタオース(G7)を生成する。ただしフルランには作用しない。

(2) pH安定性(ブリットン-ロビンソン緩衝液)

いずれも、40℃、30分間処理条件下で、pH6.5~11.0の範囲で70%以上の残存活性を示す。

(3) 作用温度範囲及び最適作用温度

いずれも、20～80℃の広範囲で作用し、最適作用温度は50～60℃である。

(4) 温度安定性

50 mMグリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH10)中にて温度を変化させ、各温度で30分間処理することにより失活の条件を調べると、いずれも40℃で80%以上の残存活性を示し、45℃でも約60%の残存活性を示した。

(5) 分子量

いずれも、ソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した分子量は55,000±5,000である。

(6) 等電点

いずれも、等電点電気泳動法により測定した等電点は4.2付近である。

(7) 界面活性剤の影響

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル硫酸エステルナトリウム塩、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステルナトリウム塩、 α -オレフィンスルホン酸ナトリウム、 α -スルホン化脂肪酸エステルナトリウム、アルキルスルホン酸ナトリウム、SDS、石鹼及びソフタノール等の各種界面活性剤0.1%溶液中で、pH10、30℃で30分間処理しても、いずれも殆ど活性阻害を受けない（活性残存率90%以上）。

(8) 金属塩の影響

各種金属塩と共に存在させて、pH10、30℃で30分間処理してその影響を調べた。

K38は、1mMのMn²⁺により阻害され（阻害率約75%）、1mMのSr²⁺及びCd²⁺により若干阻害される（阻害率約30%）。

K36は、1mMのMn²⁺により阻害され（阻害率約95%）、1mMのHg²⁺、Be²⁺及びCd²⁺により若干阻害される（阻害率30～40%）。

【0034】

実施例1 液化型 α -アミラーゼ遺伝子のクローニング

KSM-K38株の菌体からSaitoとMiuraの方法(Biochim. Biophys. Acta, 72, 619, 1961)の方法によって抽出した染色体DNAを鑄型とし、プライマ

-K38US（配列番号18）及びK38DH（配列番号19）を用いて、PCR反応によって配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する液化型アルカリ α -アミラーゼ（以下K38AMYと記載）をコードする遺伝子断片（約1.5kb）を増幅した。これを制限酵素Sa1Iによって切断後、発現ベクターpHSP64（特開平6-217781）のSa1I-SmaI部位に挿入することによって、pHSP64に含まれるBacillus sp. KSM-64 (FERM P-10482)株のアルカリセルラーゼ遺伝子に由来する強力プロモーターの下流に、K38AMYの構造遺伝子が結合した組換えプラスミドpHSP-K38を構築した（図1）。

【0035】

また、同様にBacillus sp. KSM-AP1378 (FERM BP-3048)株（特開平9-336392）から抽出した染色体DNAを鑄型とし、プライマーLAUS（配列番号20）とLADH（配列番号21）を用いたPCR反応によって増幅した配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する液化型 α -アミラーゼ（以下、LAMYと記載）をコードする遺伝子断片（約1.5kb）を、上記と同様に発現ベクターpHSP64のSa1I-SmaI部位に挿入することによって、組換えプラスミドpHSP-LAMYを構築した（図1）。

【0036】

実施例2 変異K38AMY遺伝子の調製-1

部位特異的変異には宝酒造社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキットを用いた。まず、実施例1で得られた組換えプラスミドpHSP-K38を鑄型とし、プライマーCLUBG（配列番号22）及びK38DH（配列番号19）を用いてPCR反応を行うことによって、KSM-64株由来の強力プロモーターの上流から液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子の下流までの約2.1kbの断片を増幅させ、これを上記キットに付属のプラスミドベクターpKF19kのSmaI部位に挿入し、変異導入用組換えプラスミドpKF19-K38を構築した（図2）。

【0037】

次に、配列番号6～15に示した各種の部位特異的変異導入用オリゴヌクレオチドプライマーをT4DNAキナーゼによって5'リン酸化した後、これと上記

のpKF19-K38を用いて、キットの方法に従って変異導入反応を行い、反応産物によって大腸菌MV1184株（コンピテントセルMV1184、宝酒造社製）の形質転換を行った。この結果得られた形質転換体から組換えプラスミドを抽出し、塩基配列の解析を行って変異の確認を行った。

【0038】

また、変異導入した遺伝子は、上記と同様にして、発現プロモーター領域と変異K38AMY遺伝子部分を再度pKF19kのSmaI部位に挿入することにより、異なる変異を導入する際の鋳型プラスミドとなり、上記と同様の方法によって更に別の変異を導入した。

【0039】

得られた各変異組換えプラスミドを鋳型とし、プライマーCLUBG（配列番号22）とK38DH（配列番号19）を用いてPCR反応を行うことによって、各変異K38AMY遺伝子断片を増幅させ、これをSalIによって切断した後、発現ベクターpHSP64（特開平6-217781）のSalI-SmaI部位に挿入して、変異K38AMY生産用プラスミドを構築した（図1）。

【0040】

実施例3 変異K38AMY遺伝子の調製-2（LAMY遺伝子とのキメラ）

K38AMY遺伝子のN末端領域をLAMY遺伝子の相当する領域と置換する変異にはリコンビナントPCR法を用いた（図3）。まず、実施例1で得られた組換えプラスミドpHSP-K38を鋳型とし、プライマーK38DH（配列番号19）及びLA-K38（配列番号16）を用いてPCR反応を行うことによって、配列番号1に示されるK38AMYのアミノ酸配列のG1n20からC末端下流までの配列をコードする断片を増幅した。一方、組換えプラスミドpHSP-LAMYを鋳型とし、プライマーCLUBG（配列番号22）とLA-K38R（配列番号17）を用いたPCR反応によって、強力プロモーターの上流から、配列番号2のLAMYのアミノ酸配列の21番目のG1yまでをコードする遺伝子断片を増幅させた。次に、得られた両DNA断片とプライマーCLUBG（配列番号22）とK38DH（配列番号19）を用いた2回目のPCR反応を行うことによって、末端にプライマーLA-K38（配列番号16）及びLA-K3

8 R (配列番号17) に由来する相補的な配列を持つ両断片が結合し、強力プロモーターの下流にLAMYの1番目のHisから21番目のGlyまでをコードする領域に続いてK38AMYのGln20以降C末までをコードする領域が結合した置換変異酵素 (LA-K38AMYと略する) をコードする遺伝子断片 (約2.1kb) が増幅された。これをSal Iによって切断した後、発現ベクター-pHSP64 (特開平6-217781) のSal I-Sma I部位に挿入して、変異K38AMY生産用プラスミドを構築した (図1)。

【0041】

実施例4 変異液化型アルカリα-アミラーゼの生産

実施例2及び3で得られた各種変異K38AMY生産用プラスミドをプロトプロマスト法 (Mol. Gen. Genet., 168, 111, 1979)により枯草菌ISW1214株 (leuA metB5 hsdM1) に導入し、得られた組換え枯草菌を液体培地 (コーンステイーブリカーナー、8% ; 肉エキス、1% ; リン酸1カリウム、0.02% ; マルトース、5% ; 塩化カルシウム、5mM ; テトラサイクリン、 $15\mu\text{g}/\text{mL}$) で30°Cで3日間培養した。得られた培養上清液をTris-HCl緩衝液 (pH 7.0) にて透析し、同緩衝液にて平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラムに吸着させ、塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出させた。この溶出液を10mMグリシン緩衝液 (pH 10.0) にて透析することにより、各変異K38AMYの精製酵素を得た。

【0042】

実施例5 耐熱性の検定-1

実施例1、2、4に記載の方法により、配列番号1における11番目のTyrをPheに置換した酵素 (Y11Fと略する) 、49番目のAsnをSerに置換した酵素 (N49Sと略する) 、84番目のGlnをGluに置換した酵素 (E84Qと略する) 、144番目のSerをProに置換した酵素 (S144Pと略する) 、167番目のGlnをGluに置換した酵素 (Q167Eと略する) 、169番目のTyrをLysに置換した酵素 (Y169Kと略する) 、178番目のAlaをGlnに置換した酵素 (A178Qと略する) 、188番目のGluをAspに置換した酵素 (E188Dと略する) 、190番目のAsnを

Pheに置換した酵素（N190Fと略する）、及び209番目のGlnをValに置換した酵素（Q209Vと略する）の精製標品を取得し、次に示す手法で耐熱性を検定した。対照として野生型K38AMYを用いた。

あらかじめ50mMグリシン緩衝液（pH10.0）を50℃にてプレインキュベートした中に、約1.2U/mLとなるよう酵素を添加後、30分後にサンプリングし、上記実施例に示す方法で残存するアミラーゼ活性を測定した。それぞれのスタート時の活性を100%として相対活性を求め、アミラーゼ残存活性とした。結果を表2に示したが、野生型K38AMYでは30分後の残存活性が、15%まで減少したことに対し、いずれの変異酵素も野生型に比べて高い残存活性を示した。

【0043】

【表2】

酵素	30分後の残存活性(%)
野性型	15
Y11F	40
N49S	30
E84Q	25
S144P	30
Q167E	46
Y169K	63
A178Q	20
E188D	30
N190F	70
Q209V	40

【0044】

実施例6 耐熱性の検定-2

実施例5に示した変異のうち、Q167E、Y169K、N190F及びQ209Vを次の様に組み合わせた変異酵素を実施例1、2、4に記載の方法により作製した。

Q167E/Y169K（QEYKと略する）

N190F/Q209V（NFQVと略する）

Q167E/Y169K/N190F/Q209V (QEYK/NFQVと略する)

これらについて実施例5と同様の手法により耐熱性を検定した。ただし、熱処理の温度は55°Cとし、対照として、Q167E、Y169K、N190F及びQ209Vを用いた。この結果、表3に示した様に、いずれの変異も、組み合わせによる耐熱性の向上が認められ、4種類の変異を組み合わせたQEYK/NFQVは55°Cにおいても30分後に85%の残存活性を示した。

【0045】

【表3】

酵素	30分後の残存活性 (%)
Q167E	7
Y169K	14
QEYK	45
N190F	20
Q209V	1
NFQV	40
QEYK/NFQV	85

【0046】

実施例7 耐熱性の検定-3

実施例6に示した変異NFQVに、実施例5で示した変異のうちE16PとS144Pを組み合わせた次の変異酵素を実施例1、2、4に記載の方法により作製した。

S144P/NFQV (SP/NFQVと略する)

E16P/S144P/NFQV (EPS/P/NFQVと略する)

これらについて実施例5と同様の手法(50°C)により耐熱性を検定した。

この結果、表4に示した様に、SP/NFQVに対してE16Pを組み合わせることで耐熱性の向上が認められた。

【0047】

【表4】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
SP/NFQV	40
EPSP/NFQV	50

【0048】

実施例8 耐熱性の検定－4

実施例4に示した変異のうちQ E Y K / N F Q Vに、配列番号1における107番目のM e tをL e uに置換した変異(M 1 0 7 Lと略する)、205番目のH i sをA r gに置換した変異(H 2 0 5 Rと略する)及び実施例3で示した変異のうちN 4 9 Sを組み合わせた次のような変異酵素を実施例1、2、4に記載の方法により作製した。

M 1 0 7 L / Q E Y K / N F Q V (ML / Q E Y K / N F Q Vと略する)

N 4 9 S / M 1 0 7 L / Q E Y K / N F Q V (NSML / Q E Y K / N F Q Vと略する)

N 4 9 S / M 1 0 7 L / H 2 0 5 R / Q E Y K / N F Q V (NSMLHR / Q E Y K / N F Q Vと略する)

これらについて実施例5と同様の手法により耐熱性を検定した。ただし、熱処理の温度は60℃とした。

この結果、ML / Q E Y K / N F Q VにN 4 9 S、更にはH 2 0 5 Rを組み合わせることによって耐熱性は相加的に向上し、NSMLHR / Q E Y K / N F Q Vは60℃においても30分後に75%の残存活性を示した(表5)。

【0049】

【表5】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
ML/QEYK/NFQV	30
NSML/QEYK/NFQV	50
NSMLHR/QEYK/NFQV	75

【0050】

実施例9 耐熱性の検定-5

実施例1、3、4に示した方法によって、K38AMYのAsp1から19番目のGlyまでの配列がLAMYの1番目のHisから21番目のGlyまでの配列と置換した変異酵素LA-K38AMYを取得した。この酵素の耐熱性を実施例5の方法によって検定した結果、表6に示した様に、置換による耐熱性の向上が認められた。

【0051】

【表6】

酵素	30分後の残存活性(%)
野性型	15
LA/K38AMY	33

【0052】

実施例10 耐熱性の検定-6

実施例6に示した変異酵素QEYK/NFQVの遺伝子について、実施例1及び3と同様の方法により、1番目のAspから19番目のGlyまでの配列がLAMYの1番目のHisから21番目のGlyまでの配列と置換する変異を導入した。この遺伝子を用いて実施例4の方法により得られた変異酵素LA-K38AMY/QEYK/NFQVについて実施例8と同様の手法により耐熱性を検定した（熱処理は60℃）。

この結果、組み合わせによって耐熱性は相加的に向上し、LA-K38AMY/QEYK/NFQVは60℃に於いても30分後に75%の残存活性を示した（表7）。

【0053】

【表7】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
LA/K38AMY	1
QBYK/NFQV	40
LA-K38AMY/QBYK/NFQV	63

【0054】

実施例11 自動食器洗浄機用洗浄剤組成物

表8に示す配合で自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を製造し、本洗浄剤に各変異酵素を配合して洗浄試験を行った。この結果、同一活性値の酵素を添加した場合、変異酵素は野生型酵素と比較して優れた洗浄効果を示した。

【0055】

【表8】

洗 剂 組 成	(%)
ブルロニックL-61	2.2
炭酸ナトリウム	24.7
炭酸水素ナトリウム	24.7
過炭酸ナトリウム	10.0
1号珪酸ナトリウム	12.0
クエン酸3ナトリウム	20.0
ポリプロピレングリコール	2.2
シリコーンKST-04(東芝シリコーン社製)	0.2
ソカランCP-A45(BASF社製)	4.0

【0056】

【発明の効果】

本発明の変異 α -アミラーゼは、高いキレート剤耐性の優れた特性及びアルカリ領域における高い比活性を有し、更に熱に対する優れた安定性を有する。従つて、自動食器洗浄機用洗浄剤、衣料用洗浄剤、澱粉液化、糖化用組成物、纖維糊抜き剤として有用である。

【0057】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>KAO CORPORATION

<120>New mutant alpha-amylase

<130>P02341106

<160>22

<210>1

<211>480

<212>PRT

<213>Bacillus sp. KSM-K38

<400>1

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu

5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu

20 25 30

Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly

35 40 45

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu

50 55 60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys

65 70 75 80

Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn

85 90 95

Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr

100 105 110

Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp

115 120 125

Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser

130 135 140

Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe

145	150	155	160
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg			
165	170	175	
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn			
180	185	190	
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val			
195	200	205	
Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp			
210	215	220	
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr			
225	230	235	240
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu			
245	250	255	
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe			
260	265	270	
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu			
275	280	285	
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Ser Tyr Asp Met			
290	295	300	
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala			
305	310	315	320
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu			
325	330	335	
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu			
340	345	350	
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly			
355	360	365	
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu			
370	375	380	

特平11-163569

Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe
385 390 395 400
Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg
405 410 415
Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser
420 425 430
Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp
435 440 445
Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp
450 455 460
Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
465 470 475 480

【0058】

<210>2

<211>485

<212>PRT

<213>Bacillus sp. KSM-AP1378

<400>2

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
5 10 15
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
20 25 30
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
 85 90 95
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 Gly Thr Glu Met Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
 165 170 175
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
 180 185 190
 Ile Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met
 195 200 205
 Asp His Pro Glu Val Ile Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
 210 215 220
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
 225 230 235 240
 Ile Lys Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
 245 250 255
 Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
 260 265 270
 Ala Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
 275 280 285
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gly Tyr Phe Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys

305	310	315	320
His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro			
325	330	335	
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
340	345	350	
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr			
355	360	365	
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ser Met Lys Ser			
370	375	380	
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Tyr Ala Tyr Gly Thr			
385	390	395	400
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu			
405	410	415	
Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp			
420	425	430	
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys His Lys Ala Gly			
435	440	445	
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile			
450	455	460	
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser			
465	470	475	480
Val Trp Val Lys Gln			
485			

【0059】

<210>3

<211>1753

<212>DNA

<213>Bacillus sp. KSM-K38

<400>3

特平11-163569

gtatgcggaa	cgtgcgcaa	aactgcgcaa	ctactagcac	tcttcaggga	ctaaaccacc	60
tttttccaa	aatgacatc	atataaacaa	atttgtctac	caatcaactat	ttaaagctgt	120
ttatgatata	tgtaagcgtt	atcattaaaa	ggaggtattt	g atg aga	aga tgg gta	176
				Met Arg Arg Trp Val		
					-20	
gta gca atg ttg gca gtg tta ttt tta ttt cct tcg gta gta gtt gca						224
Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe Pro Ser Val Val Val Ala						
-15	-10		-5			
gat gga ttg aac ggt acg atg atg cag tat tat gag tgg cat ttg gaa						272
Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu						
5	10		15			
aac gac ggg cag cat tgg aat cgg ttg cac gat gat gcc gca gct ttg						320
Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu						
20	25		30			
agt gat gct ggt att aca gct att tgg att ccg cca gcc tac aaa ggt						368
Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly						
35	40		45			
aat agt cag gcg gat gtt ggg tac ggt gca tac gat ctt tat gat tta						416
Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu						
50	55		60			
gga gag ttc aat caa aag ggt act gtt cga acg aaa tac gga act aag						464
Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys						
65	70		75		80	
gca cag ctt gaa cga gct att ggg tcc ctt aaa tct aat gat atc aat						512
Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn						
85	90		95			
gta tac gga gat gtc gtg atg aat cat aaa atg gga gct gat ttt acg						560
Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr						
100	105		110			

特平11-163569

gag	gca	gtg	caa	gct	gtt	caa	gta	aat	cca	acg	aat	cgt	tgg	cag	gat	608
Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Val	Gln	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Arg	Trp	Gln	Asp	
115															125	
att	tca	ggt	gcc	tac	acg	att	gat	gcg	tgg	acg	ggt	ttc	gac	ttt	tca	656
Ile	Ser	Gly	Ala	Tyr	Thr	Ile	Asp	Ala	Trp	Thr	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	
130															140	
ggg	cgt	aac	aac	gcc	tat	tca	gat	ttt	aag	tgg	aga	tgg	ttc	cat	ttt	704
Gly	Arg	Asn	Asn	Ala	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Phe	His	Phe	
145															160	
aat	ggt	gtt	gac	tgg	gat	cag	cgc	tat	caa	gaa	aat	cat	att	ttc	cgc	752
Asn	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Arg	Tyr	Gln	Glu	Asn	His	Ile	Phe	Arg	
165															175	
ttt	gca	aat	acg	aac	tgg	aac	tgg	cga	gtg	gat	gaa	gag	aac	ggt	aat	800
Phe	Ala	Asn	Thr	Asn	Trp	Asn	Trp	Arg	Val	Asp	Glu	Glu	Asn	Gly	Asn	
180															190	
tat	gat	tac	ctg	tta	gga	tcg	aat	atc	gac	ttt	agt	cat	cca	gaa	gta	848
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Asp	Phe	Ser	His	Pro	Glu	Val	
195															205	
caa	gat	gag	ttg	aag	gat	tgg	ggt	agc	tgg	ttt	acc	gat	gag	tta	gat	896
Gln	Asp	Glu	Leu	Lys	Asp	Trp	Gly	Ser	Trp	Phe	Thr	Asp	Glu	Leu	Asp	
210															220	
ttg	gat	ggt	tat	cgt	tta	gat	gct	att	aaa	cat	att	cca	ttc	tgg	tat	944
Leu	Asp	Gly	Tyr	Arg	Leu	Asp	Ala	Ile	Lys	His	Ile	Pro	Phe	Trp	Tyr	
225															240	
aca	tct	gat	tgg	gtt	cgg	cat	cag	cgc	aac	gaa	gca	gat	caa	gat	tta	992
Thr	Ser	Asp	Trp	Val	Arg	His	Gln	Arg	Asn	Glu	Ala	Asp	Gln	Asp	Leu	
245															255	
ttt	gtc	gta	ggg	gaa	tat	tgg	aag	gat	gac	gta	ggt	gct	ctc	gaa	ttt	1040
Phe	Val	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Lys	Asp	Asp	Val	Gly	Ala	Leu	Glu	Phe	

特平11-163569

260	265	270	
tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt cca ctt			1088
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu			
275	280	285	
aat tat aat ttt tac cgg gct tca caa caa ggt gga agc tat gat atg			1136
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Ser Tyr Asp Met			
290	295	300	
cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa gcg cat ccg atg cat gca			1184
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala			
305	310	315	320
gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag cca ggg gag tca tta gag			1232
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu			
325	330	335	
tca tgg gtt gct gat tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca att ttg			1280
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu			
340	345	350	
acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt tac ggt gat tac tat ggg			1328
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly			
355	360	365	
att cct aac gat aac att tca gct aaa aaa gat atg att gat gag ctg			1376
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu			
370	375	380	
ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc acg cag cat gac tat ttt			1424
Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe			
385	390	395	400
gat cat tgg gat gtt gta gga tgg act agg gaa gga tct tcc tcc aga			1472
Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg			
405	410	415	

特平11-163569

cct aat tca ggc ctt gcg act att atg tcg aat gga cct ggt ggt tcc			1520
Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser			
420	425	430	
aag tgg atg tat gta gga cgt cag aat gca gga caa aca tgg aca gat			1568
Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp			
435	440	445	
tta act ggt aat aac gga gcg tcc gtt aca att aat ggc gat gga tgg			1616
Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp			
450	455	460	
ggc gaa ttc ttt acg aat gga gga tct gta tcc gtg tac gtg aac caa			1664
Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln			
465	470	475	480
taacaaaaag ccttggagaag ggattcctcc ctaactcaag gctttctta tgtcgcttag			1724
cttaacgctt ctacgacttt gaagctta			1753

[0060]

<210>4

<211>480

<212>PRT

<213>Bacillus sp. KSM-K36

<400>4

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu

5	10	15
---	----	----

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Glu Ala Leu

20	25	30
----	----	----

Ser Asn Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly

35	40	45
----	----	----

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu

50	55	60
----	----	----

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys

65	70	75	80
Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn			
85	90	95	
Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Leu Gly Ala Asp Phe Thr			
100	105	110	
Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Ser Asn Arg Trp Gln Asp			
115	120	125	
Ile Ser Gly Val Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Pro			
130	135	140	
Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe			
145	150	155	160
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Leu Phe Arg			
165	170	175	
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn			
180	185	190	
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val			
195	200	205	
Gln Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp			
210	215	220	
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr			
225	230	235	240
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Ser Glu Ala Asp Gln Asp Leu			
245	250	255	
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe			
260	265	270	
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu			
275	280	285	
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Lys Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met			
290	295	300	

Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Ile His Ala
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu
 340 345 350
 Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly
 355 360 365
 Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu
 370 375 380
 Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe
 385 390 395 400
 Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Thr Ser Ser Arg
 405 410 415
 Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser
 420 425 430
 Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp
 435 440 445
 Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp
 450 455 460
 Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
 465 470 475 480

【0061】

<210>5

<211>1625

<212>DNA

<213>Bacillus sp.KSM-K36

<400>5

atgatatatg taagcgttat cattaaaagg aggtatttg atg aaa aga tgg gta 54

Met Lys Arg Trp Val

-20

gta gca atg ctg gca gtg tta ttt tta ttt cct tcg gta gta gtt gca			102
Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe Pro Ser Val Val Val Ala			
-15	-10	-5	
gat ggc ttg aat gga acg atg atg cag tat tat gag tgg cat cta gag			150
Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu			
5	10	15	
aat gat ggg caa cac tgg aat cgg ttg cat gat gat gcc gaa gct tta			198
Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Glu Ala Leu			
20	25	30	
agt aat gcg ggt att aca gct att tgg ata ccc cca gcc tac aaa gga			246
Ser Asn Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly			
35	40	45	
aat agt cag gct gat gtt ggg tat ggt gca tac gac ctt tat gat tta			294
Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu			
50	55	60	
ggg gag ttt aat caa aaa ggt acc gtt cga acg aaa tac ggg aca aag			342
Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys			
65	70	75	80
gct cag ctt gag cga gct ata ggg tcc cta aag tcg aat gat atc aat			390
Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn			
85	90	95	
gtt tat ggg gat gtc gta atg aat cat aaa tta gga gct gat ttc acg			438
Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Leu Gly Ala Asp Phe Thr			
100	105	110	
gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cct tcg aac cgt tgg cag gat			486
Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Ser Asn Arg Trp Gln Asp			
115	120	125	

特平1 1—1 6 3 5 6 9

att tca ggt gtc tac acg att gat gca tgg acg gga ttt gac ttt cca	534
Ile Ser Gly Val Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Pro	
130 135 140	
ggg cgc aac aat gcc tat tcc gat ttt aaa tgg aga tgg ttc cat ttt	582
Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe	
145 150 155 160	
aat ggc gtt gac tgg gat caa cgc tat caa gaa aac cat ctt ttt cgc	630
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Leu Phe Arg	
165 170 175	
ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga gtg gat gaa gag aat ggt aat	678
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn	
180 185 190	
tat gac tat tta tta gga tcg aac att gac ttt agc cac cca gag gtt	726
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val	
195 200 205	
caa gag gaa tta aag gat tgg ggg agc tgg ttt acg gat gag cta gat	774
Gln Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp	
210 215 220	
tta gat ggg tat cga ttg gat gct att aag cat att cca ttc tgg tat	822
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr	
225 230 235 240	
acg tca gat tgg gtt agg cat cag cga agt gaa gca gac caa gat tta	870
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Ser Glu Ala Asp Gln Asp Leu	
245 250 255	
ttt gtc gta ggg gag tat tgg aag gat gac gta ggt gct ctc gaa ttt	918
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe	
260 265 270	
tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt ccg ctc	966
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu	

特平 1 1 - 1 6 3 5 6 9

275	280	285	
aat tat aat ttt tac cgg gct tca aag caa ggc gga agc tat gat atg			1014
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Lys Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met			
290	295	300	
cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa gca cat ccg att cat gca			1062
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Ile His Ala			
305	310	315	320
gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag cca gga gag tca tta gaa			1110
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu			
325	330	335	
tca tgg gtc gct gat tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca atc ttg			1158
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu			
340	345	350	
acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt tac ggt gac tac tat ggg			1206
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly			
355	360	365	
att cct aac gat aac att tca gct aag aag gat atg att gat gag ttg			1254
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu			
370	375	380	
ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc aca caa cat gac tat ttt			1302
Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe			
385	390	395	400
gat cat tgg gat atc gtt gga tgg aca aga gaa ggt aca tcc tca cgt			1350
Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Thr Ser Ser Arg			
405	410	415	
cct aat tcg ggt ctt gct act att atg tcc aat ggt cct gga gga tca			1398
Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pr Gly Gly Ser			
420	425	430	
aaa tgg atg tac gta gga cag caa cat gca gga caa acg tgg aca gat			1446

特平1 1—1 6 3 5 6 9

Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp

435

440

445

tta act ggc aat cac gcg gcg tcg gtt acg att aat ggt gat ggc tgg 1494

Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp

450

455

460

ggc gaa ttc ttt aca aat gga gga tct gta tcc gtg tat gtg aac caa 1542

Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln

465

470

475

480

taataaaaag ccttgagaag ggattcctcc ctaactcaag gctttctta tgtcgittag 1602

ctcaacgctt ctacgaagct tta 1625

【0 0 6 2】

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>6

atgatgcagt atttgagtg gcatttgaa 30

【0 0 6 3】

<210>7

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>7

tatgagtggc atttgccaaa cgacggcag cat 33

【0 0 6 4】

<210>8

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>8

ccagcctaca aaggta~~c~~tgc~~t~~gat gtt 33

[0 0 6 5]

<210>9

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>9

gcacagcttc aacgagctat t 21

[0 0 6 6]

<210>10

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>10

ttcgactt ccagggcgta a 21

[0 0 6 7]

<210>11

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>11

catatttcc gcttcaaaa tacgaactgg aac 33

[0 0 6 8]

<210>12

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>12

aactggcgag tggatgatga gaacggtaat tat 33

[0069]

<210>13

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>13

tggatgaaga gttcggtaat tatga 25

[0070]

<210>14

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>14

aatatcgact ttagtcgtcc agaagtacaa gat 33

[0071]

<210>15

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>15

agtcatccag aggtcgtaga tgagttgaag gat 33

[0072]

<210>16

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>16

atttgccaaa tgacgggcag cattggaatc gggtt 34

【0073】

<210>17
<211>34
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<400>17
aaccgattcc aatgctgcc gtcatttggc aaat 34

【0074】

<210>18
<211>40
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<400>18
gggtcgacca gcacaagccg atggattgaa cggtaacgatg 40

【0075】

<210>19
<211>29
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<400>19
taaagctttt gttattggtt cacgtacac 29

【0076】

<210>20
<211>30
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<400>20
gagtcgacca gcacaagccc atcataatgg 30

【0077】

<210>21
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<400>21
taaagcttca atttatattg g 21

【0078】

<210>22
<211>27
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<400>22
ccagatctac ttaccatTTT agagtca 27

【図面の簡単な説明】

【図1】

KSM-K38株及びKSM-AP1378株由来のα-アミラーゼ生産用組換えプラスミドの構築方法を示す図である。

【図2】

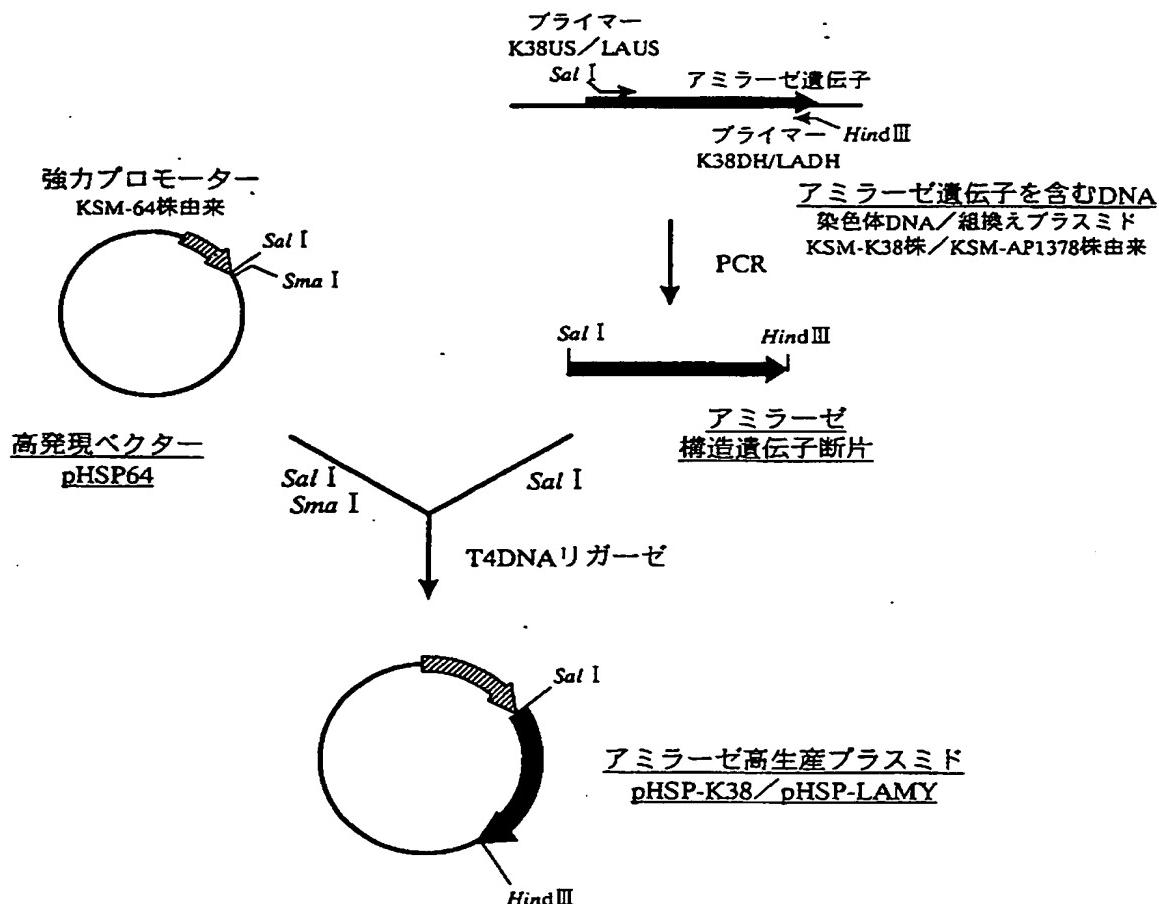
KSM-K38株由来のα-アミラーゼ遺伝子の変異導入方法を示す模式図である。

【図3】

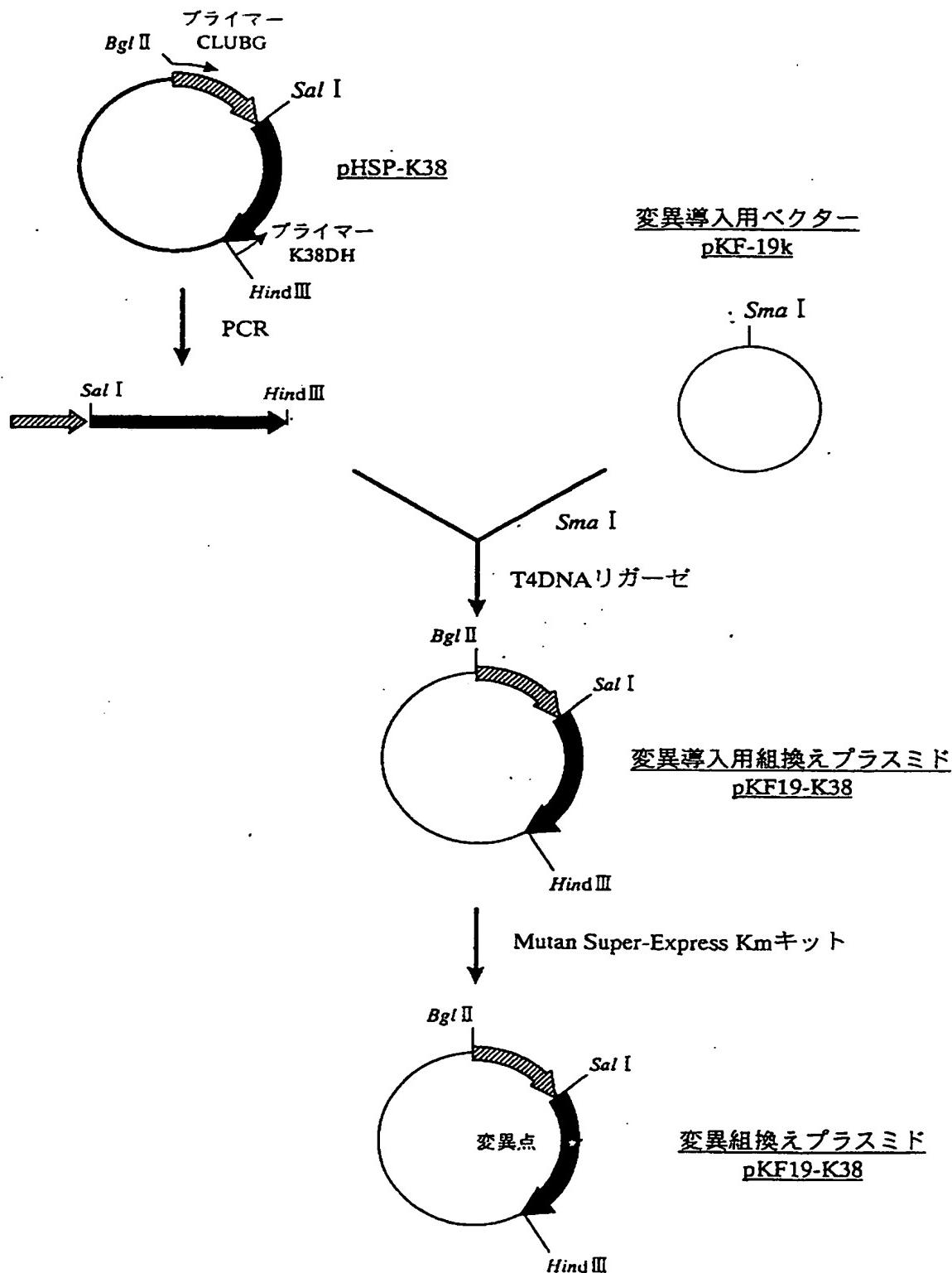
KSM-K38株由来のα-アミラーゼ遺伝子のN末端配列をKSM-AP1378株由来のα-アミラーゼ遺伝子のN末端領域と置換する方法を示す図である。

【書類名】 図面

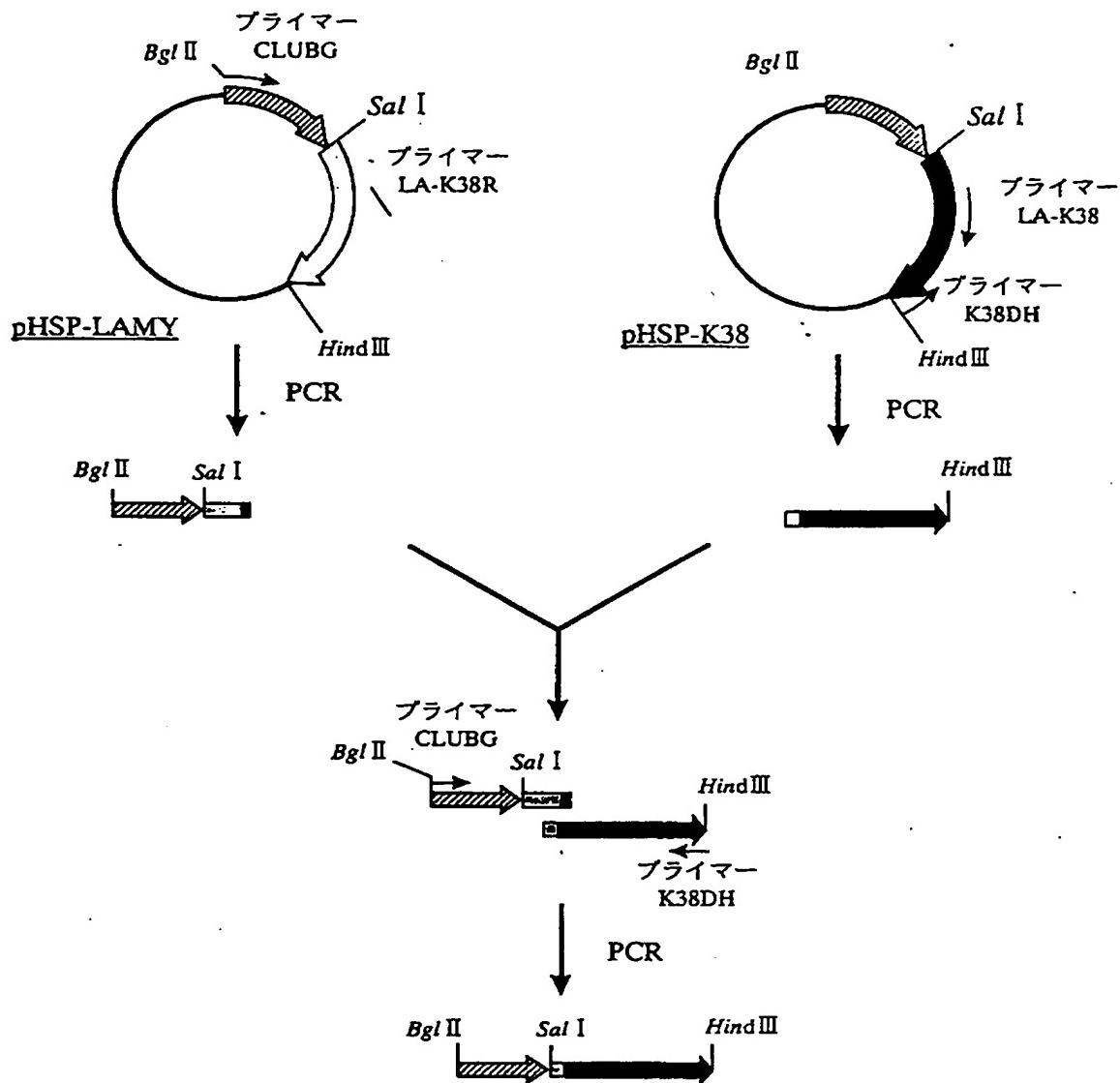
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する α -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の167番目のGln、169番目のTyr、178番目のAla等のアミノ酸残基の1残基以上を置換又は欠失させてなる変異 α -アミラーゼ、当該変異 α -アミラーゼをコードする遺伝子、ベクター、形質転換細胞、形質転換細胞を培養することを特徴とする変異 α -アミラーゼの製造方法、当該変異 α -アミラーゼを含有する洗浄剤組成物。

【効果】 本発明の変異 α -アミラーゼは、高いキレート剤耐性の優れた特性及びアルカリ領域における高い比活性を有し、更に熱に対する優れた安定性を有することから、自動食器洗浄機用洗浄剤、衣料用洗浄剤等として有用である。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [00000918]

1. 変更年月日 1990年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

氏 名 花王株式会社